



ANTI-nDNA ANTIBODIES (nDNA)

Indirect Immunofluorescence CRITHIDIA LUCILIAE



A.MENARINI
diagnostics

COD 50063 20 x 12 tests

COD 50064 10 x 12 tests

Only for *in vitro* use in the clinical laboratory

INTENDED USE

Reagents for the qualitative determination of anti-nDNA antibodies in human serum by indirect immunofluorescence.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Serum anti-nDNA antibodies bind to the corresponding antigen present in *Crithidia luciliae*. The resulting antigen-antibody complexes are detected by means of a fluorescein labeled anti-human immunoglobulin, and visualized with the aid of a fluorescence microscope¹.

CONTENTS

		COD 50063	COD 50064
SLIDE	Slides	10 x 6 tests	10 x 12 tests
PBS	PBS (10x)	1 x 100 mL	-
CONTROL +	nDNA Positive Control	1 x 1 mL	-
CONTROL -	Negative Control	1 x 1 mL	-
CONJUGATE	IgG FITC/Evans	1 x 5 mL	-
MOUNT	Mounting Medium	1 x 5 mL	-
COVER SLD	Coverslips	1 x 12	-

COMPOSITION

SLIDE *Crithidia luciliae* fixed on each well.

PBS Sodium phosphate 112.5 mmol/L, potassium phosphate 30 mmol/L, sodium chloride 1.15 mol/L, sodium azide 0.95 g/L, pH 7.2.

CONTROL+ Human serum containing anti-native DNA antibodies (nDNA), sodium azide 0.95 g/L.

CONTROL - Human serum, sodium azide 0.95 g/L.

CONJUGATE Goat anti-human IgG conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC), Evans blue 0.01 g/L, sodium azide 0.95 g/L.

MOUNT Mowiol 1%, Glycerol 87%, Tris 20 mmol/L, sodium azide 0.95 g/L.

Human sera used in the preparation of the positive and negative controls have been tested and found to be negative for the presence of antibodies anti-HIV and anti-HCV, as well as for HBs antigen. However, the controls should be handled cautiously as potentially infectious.

STORAGE

Store at 2-8°C.

Reagents are stable until the expiry date shown on the label when stored tightly closed and if contamination is prevented during their use.

Indications of deterioration:

- Liquid components: Presence of particulate material, turbidity.
- Slides: rips in the sealing bag, macroscopic defects on the cell culture like scratches or monolayer peeling off.

AUXILIARY REAGENTS

PBS PBS (10x)

CONJUGATE IgG FITC/Evans

MOUNT Mounting Medium

CONTROL + nDNA Positive Control: Human serum containing anti-native DNA antibodies (nDNA), sodium azide 0.95 g/L.

CONTROL - Negative Control.

REAGENT PREPARATION

PBS: Dilute PBS 1/10 with distilled water. Stable 1 month at 2-8°C, if stored at the recommended temperature, well closed and care is taken to prevent contamination during its use.

All other reagents are provided ready to use.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Moist chamber
- Wash tray
- Fluorescence microscope equipped with a 495 nm excitation filter and a 525 nm emission filter for FITC visualization

SAMPLES

Serum or plasma collected by standard procedures. Stable 7 days at 2-8°C.

Dilute samples 1/10 in PBS (see Reagent Preparation) before the assay.

For titration of positive samples, make two-fold serial dilutions starting from 1/20 in PBS.

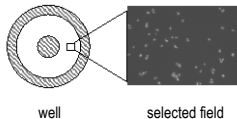
However, each laboratory should establish its own sample dilution based on the population characteristics.

PROCEDURE

1. Bring the reagents and samples to room temperature.
2. Place 1 drop (50 μ L) of the diluted sample or Control on each slide well, making sure that it is completely covered (Note 1).
3. Incubate the slide for 30 minutes at room temperature (15-30°C) into a moist chamber.
4. Drain sample drops off by gently tapping the inclined slide. Avoid cross-contamination of the sera.
5. Rinse gently the slide with PBS (see Reagent Preparation) (Note 2).
6. Wash thoroughly the slide by immersing in a washing tray filled with PBS for 5 minutes. Change PBS and repeat wash.
7. Carefully dry off the slides by using the blotting paper provided. Keep the substrate moist along the procedure.
8. Place 1 drop of Conjugate on each well. Incubate the slide for 30 minutes at room temperature (15-30°C) into a moist chamber.
9. Wash (step 6) and dry (step 7).
10. Place several drops of Mounting Medium on the slide and cover with a coverslip avoiding the formation of air bubbles.

READING

Examine the slide using the fluorescence microscope (250-400x). For best results, the slides should be read immediately. Select reading fields in the area indicated in the picture, between the center area and the edge area, with uniform spacing between cells. Fluorescent intensity in the center and edge areas is not representative of the slide preparation.



Crithidia luciliae is a hemoflagellate with a modified mitochondrion called kinetoplast containing double stranded DNA (nDNA), not associated to histones, which apparently lacks any other nuclear antigen. The kinetoplast is a rounded organelle smaller than the nucleus and located between this and the basal body (2,3,4).

Observation of specific fluorescent staining of the kinetoplasts at the recommended dilution should be considered as a positive result. Nuclei, basal body or flagellum might give fluorescent staining but only kinetoplast fluorescence must be scored.

Positive sera may be titered. The serum titer is defined as the highest dilution showing a positive result.

QUALITY CONTROL

Positive Control (CONTROL +) and Negative Control (CONTROL -) provided with kits cod 50063 should be tested together with the patients samples, in order to verify the assay performance.

Positive Control (CONTROL +) should give the above described specific staining.

Negative Control (CONTROL -) should not give any specific staining.

Each laboratory should establish its own internal Quality Control scheme and procedures for corrective action if controls do not recover within the acceptable tolerances.

ASSAY CHARACTERISTICS

The IgG FITC/Evans conjugate is calibrated versus the International Standard of the WHO for sheep anti-human immunoglobulins conjugated with FITC.

DIAGNOSTIC CHARACTERISTICS

The *Crithidia luciliae* immunofluorescence test for anti-nDNA antibodies has a high diagnostic specificity, but a fairly high diagnostic sensitivity for Systemic Lupus Erythematosus (SLE). They are the most frequently detected autoantibodies associated to SLE: 95% in SLE patients with renal involvement, 50 – 70% in SLE patients without renal involvement and 40% in patients with inactive SLE. Anti-nDNA antibodies are rarely found in healthy individuals (5).

Menarini anti-nDNA antibodies kit was used to test 80 sera from SLE patients as well as healthy donors. The results are described as follows

	N	POS	NEG	Sens.	Spec.
SLE (<i>systemic lupus eritematosus</i>)	43	29	14	67%	100%
SLE without renal involvement	25	15	10	60%	100%
SLE with renal involvement	18	14	4	78%	100%
Other autoimmune diseases	20	0	20		
Healthy controls	17	0	17		

Clinical diagnosis should not be made on the findings of a single test result, but should integrate both clinical and laboratory data.

NOTES

1. Avoid touching the cells fixed into the wells along the procedure.
2. Use a squeeze bottle or a pipette to wash the slides, avoiding cross-contamination among the adjacent samples.

BIBLIOGRAPHY

1. Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Aarden LA, de Groot ER and Feltkamp TEW. Immunology of DNA III. Crithidia luciliae, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique. Ann NY Acad Sci 1975; 254: 505-515.
3. Stingl G et al. An Immunofluorescence Procedure for the Demonstration of Antibodies to Native, Double-Stranded DNA and Circulating DNA-Anti-DNA Complexes. Clin Immunol and Immunopathol 1976; 6: 131-140.
4. Konstantinov KN and Russanova VR. Evidence for absence of histones in the Crithidia luciliae kinetoplast: a study with ant-H2A and monoclonal anti-H3 antibodies. British Journal of Dermatology 1987; 117: 451-456.
5. Conrad K, Schößler W, Hiepe F. Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases. A Diagnostic Reference. Autoantigens, autoantibodies, autoimmunity. Vol. 2. Pabst Science Publishers, 2002.

**ANTICORPI ANTI-nDNA (nDNA)**

Immunofluorescenza Indiretta CRITHIDIA LUCILIAE

**A.MENARINI**
diagnostics

COD 50063 20 x 12 det.

COD 50064 10 x 12 det.

Solo per uso in vitro nel laboratorio clinico

USO PREVISTO

Reattivi per la determinazione qualitativa degli anticorpi anti-nDNA utilizzati nei metodi di immunofluorescenza indiretta per la rilevazione di anticorpi nel siero umano.

PRINCIPIO DEL METODO

Gli anticorpi anti-nDNA del siero si legano al corrispondente antigene presente nella Crithidia luciliae. Una volta legati, gli anticorpi si rivelano mediante incubazione con un anticorpo contro le immunoglobuline umane coniugato con fluoresceina e si visualizzano in microscopia a fluorescenza¹.

CONTENUTO

		COD 50063	COD 50064
SLIDE	Vetrini	10 x 6 det.	10 x 12 det.
PBS	PBS (10x)	1 x 100 mL	-
CONTROL +	Cont. Posit. nDNA	1 x 1 mL	-
CONTROL -	Controllo Negativo	1 x 1 mL	-
CONJUGATE	IgG FITC/Evans	1 x 5 mL	-
MOUNT	Mounting Medium	1 x 5 mL	-
COVER SLD	Vetrini coprioggetto	1 x 12	-

COMPOSIZIONE**SLIDE** Crithidia luciliae fissate in ogni pozzetto.**PBS** Fosfato di sodio 112,5 mmol/L, fosfato di potassio 30 mmol/L, cloruro sodico 1,15 mol/L, azide di sodio 0,95 g/L, pH 7,2.**CONTROL +** Siero umano con anticorpi anti-DNA nativo (nDNA), azide di sodio 0,95 g/L.**CONTROL -** Siero umano, azide di sodio 0,95 g/L.**CONJUGATE** Anticorpi di capra anti-immunoglobuline IgG umane coniugati con isotiocianato di fluoresceina (FITC), blu di Evans 0,01 g/L, azide di sodio 0,95 g/L**MOUNT** Mezzo di Montaggio: Mowiol 1%, Glicerolo 87%, Tris 20 mmol/L, azide di sodio 0,95 g/L.

I sieri umani utilizzati nella preparazione del Controllo Positivo e Negativo, è negativo per l' antigene HBs e per gli anticorpi anti-HCV e anti-HIV. Tuttavia, i Controlli vanno trattati con precauzione come potenzialmente infettivi.

CONSERVAZIONE

Conservare a 2-8°C.

I reattivi sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull' etichetta, purchè conservati ben chiusi ed evitandone la contaminazione durante l'uso.

Indicazioni di deterioramento:

- Componenti liquidi: Presenza di particelle, torbidità.
- Portaoggetti: Rottura della busta contenente il vetrino, difetti macroscopici come distacco o alterzioni delle cellule.

REATTIVI AUSILIARI

PBS PBS (10x).

CONJUGATE IgG FITC/Evans.

MOUNT Mezzo di Montaggio.

CONTROL + Controllo Positivo nDNA: Siero umano con anticorpi anti-DNA nativo (nDNA), azide di sodio 0,95 g/L.

CONTROL- Controllo Negativo.

PREPARAZIONE DEI REATTIVI

PBS: Effettuare una diluizione 1/10 del PBS con acqua distillata. Stabile 1 mese a 2-8°C, se mantenuto alla temperatura raccomandata, ben chiuso e se si presta attenzione a evitare la contaminazione durante l'uso.

Gli altri componenti sono pronti all'uso.

MATERIALI AGGIUNTIVI

- Camera umida
- Vaschetta di lavaggio
- Microscopio in fluorescenza equipaggiato con filtri di eccitazione da 495 nm e di emissione da 525 nm per la visualizzazione del FITC.

CAMPIONI

Siero o plasma raccolti mediante procedimenti standard. Stabile una settimana a 2-8°C.

Diluire i campioni 1/10 in PBS (vedere Preparazione dei Reattivi) prima del test.

Per la titolazione di un campione positivo, realizzare diluizioni doppie in PBS a partire da 1/20.

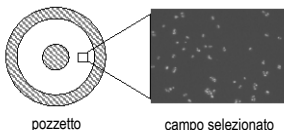
Tuttavia, ogni laboratorio dovrà predisporre un proprio esempio di diluizione sulla base delle caratteristiche della popolazione.

PROCEDIMENTO

1. Portare i reattivi ed i campioni a temperatura ambiente.
2. Depositare una goccia (50 μ L) di campione diluito o dei Controlli nei pozzetti del vetrino, procurando di coprirlo perfettamente (Nota 1).
3. Incubare il vetrino in camera umida per 30 minuti a temperatura ambiente (15-30°C).
4. Eliminare le gocce dei campioni inclinando il vetrino e picchiettandolo leggermente. Evitare di mescolare i sieri.
5. Eliminare il siero rimanente nel vetrino lavandolo con PBS (vedere preparazione del Reattivo). (Nota 2).
6. Lavare il vetrino immergendolo in una vaschetta con PBS per 5 minuti. Cambiare il PBS e ripetere il lavaggio.
7. Asciugare con cura il vetrino utilizzando la carta bibula fornita. Il substrato deve restare sempre umido.
8. Depositare una goccia di Conjugate in ogni pozzetto. Collocare il vetrino in una camera umida e incubare a temperatura ambiente (15-30°C) per 30 minuti.
9. Lavare (vedere punto 6) ed asciugare (vedere punto 7).
10. Depositare alcune gocce di Mounting Medium sopra il vetrino e porre un coprioggetti evitando la formazione di bolle d'aria.

LETTURA

Esaminare il vetrino con un microscopio a fluorescenza (250-400x). Si raccomanda una lettura immediata. Per eseguire la lettura, selezionare campi di osservazione della zona indicata nello schema, tra il centro e la periferia del pozzetto, con distribuzione di cellule uniformi. L' intensità di fluorescenza alla periferia o al centro del pozzetto non deve essere considerata.



La *Crithidia luciliae* è un emoflagellato che possiede un mitocondrio modificato, denominato kinetoplasto, che contiene DNA a doppia elica (nDNA), non associato a istoni, e che apparentemente non presenta nessun altro antigene. Il kinetoplasto è un organulo di aspetto tondo, di grandezza inferiore al nucleo e situato tra questi ed il corpuscolo basale^(2,3,4).

L' osservazione di fluorescenza in corrispondenza del cinetoplasto alla diluizione raccomandata indica un risultato positivo. Il nucleo, il corpuscolo basale o il flagello possono risultare fluorescenti, ma non sono correlati a anticorpi anti n-DNA.

I campioni positivi possono essere titolati. Si definisce titolo la più alta diluizione che dà risultato positivo.

CONTROLLO DI QUALITA'

Il Controllo Positivo (CONTROL+) e il Controllo Negativo (CONTROL-) forniti con i kits cod 50063 debbono essere testati insieme ai campioni dei pazienti per verificare la funzionalità del procedimento.

Il Controllo Positivo (CONTROL+) deve presentare il pattern tipico, descritto sopra.

Il Controllo Negativo (CONTROL-) non deve dare luogo a nessun tipo di fluorescenza specifica.

Ogni laboratorio deve stabilire il proprio programma di Controllo di Qualità interno, così pure procedimenti di correzione nel caso che i controlli non rientrino nelle tolleranze accettabili.

CARATTERISTICHE DEL TEST

Il coniugato IgG FITC/Evans è stato calibrato secondo lo standard internazionale dell'OMS di anti-immunoglobuline umane di pecora coniugate con FITC.

CARATTERISTICHE DIAGNOSTICHE

La determinazione di anticorpi anti-dsDNA in immunofluorescenza nella *Crithidia luciliae* ha una elevata specificità diagnostica, e una sensibilità diagnostica moderatamente elevata per il Lupus Eritematoso Sistemico (SLE). Questi anticorpi sono quelli più frequentemente rilevati nel SLE: 95% in pazienti con SLE con implicazione renale, 50 – 70% in pazienti con SLE senza implicazione renale e 40% in pazienti con SLE inattivo. Gli anticorpi anti-dsDNA raramente si riscontrano in individui sani (5) .

Il kit di anti-nDNA Menarini è stato usato con 80 sieri di pazienti con SLE così come di donatori sani. I risultati sono riportati a seguire:

	N	POS	NEG	Sens.	Espec.
SLE (<i>lupus eritematoso sistemico</i>)	43	29	14	67%	100%
<i>SLE senza implicazione renale</i>	25	15	10	60%	100%
<i>SLE con implicazione renale</i>	18	14	4	78%	100%
Altre Malattie Autoimmuni	20	0	20		
Controlli sani	17	0	17		

La diagnosi clinica non deve basarsi esclusivamente sul risultato di questo test, ma deve integrare i dati clinici e di laboratorio.

NOTE

1. Evitare di toccare le cellule del pozzetto durante tutta la prova.
2. Utilizzare una spruzzetta o pipetta per questo lavaggio, evitando la possibile contaminazione con i campioni adiacenti.

BIBLIOGRAFIA

1. Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Aarden LA, de Groot ER and Feltkamp TEW. Immunology of DNA III. Crithidia luciliae, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique. Ann NY Acad Sci 1975; 254: 505-515.
3. Stingl G et al. An Immunofluorescence Procedure for the Demonstration of Antibodies to Native, Double-Stranded DNA and Circulating DNA-Anti-DNA Complexes. Clin Immunol and Immunopathol 1976; 6: 131-140.
4. Konstantinov KN and Russanova VR. Evidence for absence of histones in the Crithidia luciliae kinetoplast: a study with ant-H2A and monoclonal anti-H3 antibodies. British Journal of Dermatology 1987; 117: 451-456.
5. Conrad K, Schöblier W, Hiepe F. Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases. A Diagnostic Reference. Autoantigens, autoantibodies, autoimmunity. Vol. 2. Pabst Science Publishers, 2002.



ANTICUERPOS ANTI-nDNA (nDNA)

Inmunofluorescencia Indirecta CRITHIDIA LUCILIAE



A.MENARINI
diagnostics

COD 50063 20 x 12 det.

COD 50064 10 x 12 det.

Sólo para uso in vitro en el laboratorio clínico

USO PREVISTO

Reactivos para la determinación cualitativa de anticuerpos anti-nDNA en suero humano mediante inmunofluorescencia.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los anticuerpos anti-nDNA del suero se unen a su correspondiente antígeno presente en Crithidia luciliae. Una vez unidos, los anticuerpos se ponen de manifiesto mediante la incubación con un anticuerpo contra las inmunoglobulinas humanas conjugado con fluoresceína y se visualizan por microscopía de fluorescencia¹.

CONTENIDO

		COD 50063	COD 50064
SLIDE	Portaobjetos	10 x 6 det.	10 x 12 det.
PBS	PBS (10x)	1 x 100 mL	-
CONTROL +	Cont. Posit. nDNA	1 x 1 mL	-
CONTROL -	Control Negativo	1 x 1 mL	-
CONJUGATE	IgG FITC/Evans	1 x 5 mL	-
MOUNT	Mounting Medium	1 x 5 mL	-
COVER SLD	Cubreobjeto	1 x 12	-

COMPOSICIÓN

SLIDE Crithidia luciliae fijadas en cada pocillo.

PBS Fosfato de sodio 112,5 mmol/L, fosfato de potasio 30 mmol/L, cloruro sódico 1,15 mol/L, azida de sodio 0,95 g/L, pH 7,2.

CONTROL+ Suero humano con anticuerpos anti-DNA nativo (nDNA), azida de sodio 0,95 g/L.

CONTROL- Suero humano, azida de sodio 0,95 g/L.

CONJUGATE Anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas IgG humanas conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), azul de Evans 0,01 g/L, azida de sodio 0,95 g/L

MOUNT Medio de Montaje: Mowiol 1%, Glicerol 87%, Tris 20 mmol/L, azida de sodio 0,95 g/L.

Los sueros humanos utilizados en la preparación del control negativo y el control positivo eran negativos para el antígeno HBs y para los anticuerpos anti-HCV y anti-HIV. Sin embargo, los controles deben tratarse con precaución como potencialmente infecciosos.

CONSERVACIÓN

Conservar a 2-8°C.

Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro:

– Componentes líquidos: Presencia de partículas, turbidez.

- Portaobjetos: Roturas en el sobre contenedor, defectos macroscópicos como ralladuras o despegues en el cultivo de células.

REACTIVOS AUXILIARES

PBS PBS (10x).

CONJUGATE IgG FITC/Evans.

MOUNT Medio de Montaje.

CONTROL+ Control Positivo nDNA: Suero humano con anticuerpos anti-DNA nativo (nDNA), azida de sodio 0,95 g/L.

CONTROL- Control Negativo.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

PBS: Efectuar una dilución 1/10 del PBS con agua destilada. Estable 1 mes a 2-8°C, si se conserva a la temperatura recomendada, bien cerrado y se tiene cuidado para evitar contaminaciones durante su uso.

Los demás componentes están listos para su uso.

EQUIPO ADICIONAL

- Cámara húmeda
- Cubeta de lavado
- Microscopio de fluorescencia equipado con filtros de excitación de 495 nm y de emisión de 525 nm para la visualización del FITC.

MUESTRAS

Suero o plasma recogidos mediante procedimientos estándar. Estable una semana a 2-8°C.

Diluir las muestras 1/10 en PBS (ver Preparación de los Reactivos) antes del ensayo.

Para la titulación de una muestra positiva, realizar diluciones dobles en PBS a partir de la 1/20.

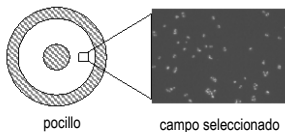
Sin embargo, cada laboratorio debería establecer su propio ejemplo de dilución basado en las características de la población.

PROCEDIMIENTO

1. Atemperar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente.
2. Depositar una gota (50 μ L) de la muestra diluida o de los Controles en los pocillos del portaobjetos, procurando cubrirlo perfectamente (Nota 1).
3. Incubar el portaobjetos en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente (15-30°C).
4. Eliminar las gotas de las muestras inclinando el portaobjetos y golpeándolo ligeramente. Evitar la mezcla de sueros.
5. Eliminar el suero remanente en el portaobjetos lavándolo con PBS (ver preparación del Reactivo). (Nota 2).
6. Lavar el portaobjetos sumergiéndolo en una cubeta con PBS durante 5 minutos. Cambiar el PBS y repetir el lavado.
7. Secar cuidadosamente el portaobjetos utilizando el papel secante suministrado. El sustrato debe permanecer siempre húmedo.
8. Depositar una gota de Conjugate en cada pocillo. Colocar el portaobjetos en una cámara húmeda e incubar a temperatura ambiente (15-30°C) durante 30 minutos.
9. Lavar (ver paso 6) y secar (ver paso 7).
10. Depositar varias gotas de Mounting Medium sobre el portaobjetos y colocar un cubreobjetos procurando evitar la formación de burbujas de aire.

LECTURA

Examinar el portaobjetos con un microscopio de fluorescencia (250-400x). Es recomendable realizar la lectura de inmediato. Para realizar la lectura, seleccionar campos de observación de la zona indicada en el esquema, entre el centro y la periferia del pocillo, con distribución de células uniformes. La intensidad de marcaje de la periferia o del centro del pocillo no es representativa de la preparación.



La *Crithidia luciliae* es un hemoflagelado que posee una mitocondria modificada, denominada kinetoplasto, que contiene DNA de doble hélice (nDNA), no asociado a histonas, y que aparentemente no presenta ningún otro antígeno. El kinetoplasto es un orgánulo de aspecto redondeado, de tamaño inferior al núcleo y situado entre éste y el corpúsculo basal ^(2,3,4).

La observación de marcaje fluorescente específico en el kinetoplasto a la dilución recomendada indica un resultado positivo. El núcleo, el cuerpo basal o el flagelo pueden originar marcaje fluorescente pero sólo debe considerarse la fluorescencia del kinetoplasto.

Las muestras positivas pueden titularse. Se define el título como la dilución mayor que da resultado positivo.

CONTROL DE CALIDAD

El Control Positivo (CONTROL+) y el Control Negativo (CONTROL-) suministrados con los kits cod 50063 deben ser ensayados junto con las muestras de los pacientes para verificar la funcionalidad del procedimiento de ensayo.

El Control Positivo (CONTROL+) debe proporcionar el marcaje específico descrito en el apartado anterior.

El Control Negativo (CONTROL-) no debe proporcionar marcaje específico alguno.

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de Control de Calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias aceptables.

CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

El conjugado IgG FITC/Evans está calibrado frente al Patrón Internacional de la OMS de anti-inmunoglobulinas humanas de oveja conjugadas con FITC.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

La determinación de anticuerpos anti-dsDNA por inmunofluorescencia en *Crithidia luciliae* tiene una elevada especificidad diagnóstica, y una sensibilidad diagnóstica moderadamente elevada para el Lupus Eritematoso Sistémico (SLE). Estos anticuerpos son los más frecuentemente detectados en SLE: 95% en pacientes con SLE con implicación renal, 50 – 70% en pacientes con SLE sin implicación renal y 40% en pacientes con SLE inactivo. Los anticuerpos anti-dsDNA raramente se encuentran en individuos sanos ⁽⁵⁾.

El kit de anti-nDNA de Menarini fue usado con 80 sueros de pacientes con SLE así como donadores sanos. Los resultados aparecen a continuación:

	N	POS	NEG	Sens.	Espec.
SLE (<i>lupus eritematoso sistémico</i>)	43	29	14	67%	100%
<i>SLE sin implicación renal</i>	25	15	10	60%	100%
<i>SLE con implicación renal</i>	18	14	4	78%	100%
Otras Enfermedades Autoinmunes	20	0	20		
Controles sanos	17	0	17		

El diagnóstico clínico no debe basarse exclusivamente en el resultado de este ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

NOTAS

1. Evitar tocar las células del pocillo durante todo el procedimiento.
2. Utilizar un frasco lavador o pipeta para este lavado, evitando la posible contaminación con las muestras adyacentes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Melnickoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Aarden LA, de Groot ER and Feltkamp TEW. Immunology of DNA III. Crithidia luciliae, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique. Ann NY Acad Sci 1975; 254: 505-515.
3. Stingl G et al. An Immunofluorescence Procedure for the Demonstration of Antibodies to Native, Double-Stranded DNA and Circulating DNA-Anti-DNA Complexes. Clin Immunol and Immunopathol 1976; 6: 131-140.
4. Konstantinov KN and Russanova VR. Evidence for absence of histones in the Crithidia luciliae kinetoplast: a study with anti-H2A and monoclonal anti-H3 antibodies. British Journal of Dermatology 1987; 117: 451-456.
5. Conrad K, Schöblier W, Hiepe F. Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases. A Diagnostic Reference. Autoantigens, autoantibodies, autoimmunity. Vol. 2. Pabst Science Publishers, 2002.



ANTICORPS ANTI-nDNA (nDNA)

Immunofluorescence Indirecte CRITHIDIA LUCILIAE



COD 50063 20 x 12 tests

COD 50064 10 x 12 tests

A utiliser uniquement in vitro dans les laboratoires cliniques

A.MENARINI
diagnostics

USAGE PRÉVU

Réactifs pour la détermination qualitative anticorps anti-nDNA dans le sérum humain par immunofluorescence indirecte.

PRINCIPE DE LA METHODE

Les anticorps anti-nDNA du sérum s'unissent aux antigènes correspondants présents chez *Crithidia luciliae*. Une fois unis, les anticorps sont révélés en les incubant avec un anticorps anti-immunoglobulines humaines conjugués à la fluorescéine et ils sont visualisés par microscopie à fluorescence¹.

CONTENU

		COD 50063	COD 50064
SLIDE	Lames	10 x 6 tests	10 x 12 tests
PBS	PBS (10x)	1 x 100 mL	-
CONTROL +	Contrôle Positif nDNA	1 x 1 mL	-
CONTROL -	Contrôle Négatif	1 x 1 mL	-
CONJUGATE	IgG FITC/Evans	1 x 5 mL	-
MOUNT	Mounting Medium	1 x 5 mL	-
COVER SLD	Couvre-lames	1 x 12	-

COMPOSITION

SLIDE *Crithidia luciliae* fixée dans chaque puits.

PBS Phosphate de sodium 112,5 mmol/L, phosphate de potassium 30 mmol/L, chlorure de sodium 1,15 mol/L, azide de sodium 0,95 g/L, pH 7,2.

CONTROL + Sérum humain contenant des anticorps anti-DNA natif (nDNA), azide de sodium 0,95 g/L.

CONTROL - Sérum humain, azide de sodium 0,95 g/L.

CONJUGATE Anticorps de chèvre anti-IgG humaine conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), bleu Evans 0,01 g/L, azide de sodium 0,95 g/L.

MOUNT Milieu de Montage: Mowiol 1%, Glycérol 87%, Tris 20 mmol/L, azide de sodium 0,95 g/L.

Les sérums humains utilisés pour la préparation des contrôles positif et négatif sont négatifs pour l'antigène HBs et pour les anticorps anti-HCV et anti-HIV. Cependant, les contrôles doivent être traités avec précaution comme potentiellement infectieux.

CONSERVATION

Conserver à 2-8°C.

Les réactifs sont stables jusqu'à la date limite indiquée sur l'étiquette à condition d'être toujours conservés bien fermés et d'éviter toute contamination pendant leur utilisation.

Indications de dégradation:

- Composants liquides: Présence de particules, turbidité.

- lames: ruptures de l'emballage, défauts macroscopiques des cultures cellulaires comme des éraflures ou des décollages de la monocouche.

REACTIFS SUPPLEMENTAIRES

PBS PBS (10x).

CONJUGATE IgG FITC/Evans.

MOUNT Milieu de Montage.

CONTROL+ Contrôle Positif nDNA: Sérum humain contenant des anticorps anti-DNA natif (nDNA), azide de sodium 0,95 g/L.

CONTROL- Contrôle négatif.

PREPARATION DU REACTIF

PBS: Effectuer une dilution 1/10 du PBS avec de l'eau distillée. Stable 1 mois à 2-8°C, s'il est conservé à la température recommandée, bien fermé et si des précautions sont prises pour éviter les contaminations pendant son utilisation.

Les autres réactifs sont prêts à l'emploi.

EQUIPEMENT SUPPLEMENTAIRE

- Chambre humide
- Boîte de lavage
- Microscope à fluorescence équipé d'un filtre à excitation 495 nm et d'un filtre à émission à 525 nm pour la visualisation FITC.

ECHANTILLONS

Le sérum ou le plasma est collecté par des procédures standards. Stables 1 semaine à 2-8°C.

Diluer l'échantillon au 1/10 dans du PBS (voir Préparation des Réactifs) avant le test.

Pour titrer les échantillons positifs, faire des doubles dilutions en série à partir de celle au 1/20 dans du PBS.

Toutefois, chaque laboratoire devrait établir son propre exemple de dilution basé sur les caractéristiques de la population.

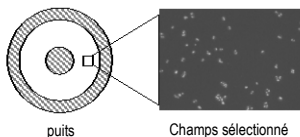
PROCEDURE

1. Placer les réactifs et les échantillons à température ambiante.
2. Déposer une goutte (50 µL) de l'échantillon dilué ou du Contrôle dans chaque puits de la lame, faire attention qu'il soit complètement recouvert (Note 1).
3. Incuber la lame 30 minutes à température ambiante (15-30°C) dans une chambre humide.
4. Eliminer les gouttes d'échantillons en tapotant doucement la lame inclinée. Eviter des contaminations entre les sérums.
5. Rincer doucement la lame avec le PBS (voir Préparation des Réactifs) (Note 2).
6. Bien laver la lame en l'immergeant dans la boîte de lavage remplie de PBS pendant 5 minutes. Changer le PBS et répéter le lavage.
7. Sécher avec précaution les lames en utilisant le papier absorbant fourni. Garder la coupe de tissu humide pendant la procédure.
8. Déposer 1 goutte de Conjugate dans chaque puits. Incuber la lame 30 minutes à température ambiante (15-30°C) dans une chambre humide.
9. Laver (étape 6) et sécher (étape 7).
10. Déposer plusieurs gouttes de Mounting Medium sur la lame et la recouvrir avec un couvre-lame en évitant la formation de bulles d'air.

LECTURE

Examiner la lame avec un microscope à fluorescence (250-400x). Il est recommandé de réaliser la lecture immédiatement. Pour réaliser la lecture, sélectionner des champs d'observation dans la zone indiquée sur le

schéma, entre le centre et la périphérie du puits, avec une distribution uniforme des cellules. L'intensité du marquage à la périphérie ou au centre du puits n'est pas représentative de la préparation.



Crithidia luciliae est un hémoflagellé qui possède une mitochondrie modifiée appelée kinétoplaste, qui contient un DNA double brin (nDNA), non associés à des histones, et qui apparemment ne présente aucun autre antigène. Le kinétoplaste est un organelle d'aspect arrondi, de taille inférieure au noyau et situé entre le noyau et le corps basal^(2,3,4).

L'observation du marquage fluorescent spécifique dans le kinétoplaste à la dilution recommandée indique un résultat positif. Le noyau, le corps basal ou le flagelle peuvent donner un marquage fluorescent mais seule la fluorescence du kinétoplaste doit être prise en compte.

Les échantillons positifs peuvent être titrés. Le titre est défini comme la dilution la plus élevée qui donne un résultat positif.

CONTROLE DE QUALITE

Le Contrôle Positif (CONTROL+) et le Contrôle Négatif (CONTROL-) fournis avec les kits cod 50063 doivent être testés ensemble sur des échantillons de patients afin de vérifier la performance du test.

Le Contrôle Positif (CONTROL+) doit donner les marquages spécifiques décrits ci-dessus.

Le Contrôle Négatif (CONTROL-) ne doit donner aucun marquage spécifique.

Chaque laboratoire doit établir ses propres protocoles et méthodes de Contrôle de Qualité interne afin d'apporter les modifications nécessaires en cas de dépassement des tolérances.

CARACTERISTIQUES DU TEST

Le conjugué IgG FITC/Evans est calibré par rapport à l'Étalon International de l'OMS d'anti-immunoglobulines humaines de brebis conjuguées avec FITC.

CARACTERISTIQUES DIAGNOSTIQUES

La détermination des anticorps anti-dsDNA par immunofluorescence chez *Crithidia luciliae* présente une spécificité de diagnostic élevée, et une sensibilité de diagnostic modérément élevée pour le Lupus Érythémateux Disséminé ou Systémique (SLE). Ces anticorps sont les plus fréquemment détectés dans les cas de SLE: 95% des patients atteints de SLE avec implication rénale, 50 – 70% des patients atteints de SLE sans implication rénale et 40% des patients atteints de SLE inactif. Les anticorps anti-dsDNA sont rarement trouvés chez les sujets sains⁽⁵⁾.

Le kit anti-nDNA de Menarini a été utilisé avec 80 sérums de patientes atteintes de SLE ainsi que des donneurs sains. Les résultats sont donnés ci-dessous:

	N	POS	NEG	Sens.	Espec.
SLE (<i>lupus érythémateux systémique</i>)	43	29	14	67%	100%
<i>SLE sans implication rénale</i>	25	15	10	60%	100%
<i>SLE avec implication rénale</i>	18	14	4	78%	100%
Autres maladies auto-immunes	20	0	20		
Contrôles sains	17	0	17		

Le diagnostic clinique ne doit pas être basé sur un test, mais il doit intégrer les données cliniques et du laboratoire.

NOTES

1. Éviter de toucher les cellules fixées dans les puits tout au long de la procédure.
2. Utiliser une pipette pour laver les lames, en évitant les contaminations entre les échantillons adjacents.

BIBLIOGRAPHIE

1. Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Aarden LA, de Groot ER and Feltkamp TEW. Immunology of DNA III. Crithidia luciliae, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique. Ann NY Acad Sci 1975; 254: 505-515.
3. Stingl G et al. An Immunofluorescence Procedure for the Demonstration of Antibodies to Native, Double-Stranded DNA and Circulating DNA-Anti-DNA Complexes. Clin Immunol and Immunopathol 1976; 6: 131-140.
4. Konstantinov KN and Russanova VR. Evidence for absence of histones in the Crithidia luciliae kinetoplast: a study with ant-H2A and monoclonal anti-H3 antibodies. British Journal of Dermatology 1987; 117: 451-456.
5. Conrad K, Schößler W, Hiepe F. Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases. A Diagnostic Reference. Autoantigens, autoantibodies, autoimmunity. Vol. 2. Pabst Science Publishers, 2002.



ANTICORPOS ANTI-nDNA (nDNA)

Imunofluorescência Indirecta CRITHIDIA LUCILIAE



A.MENARINI
diagnostics

COD 50063 20 x 12 det.

COD 50064 10 x 12 det.

Só para uso in vitro no laboratório clínico

UTILIZAÇÃO PREVISTA

Reagentes para a determinação qualitativa de anticorpos anti-nDNA em soro humano pelo método de imunofluorescência indirecta.

FUNDAMENTO DO MÉTODO

Os anticorpos anti-nDNA do soro são unidos ao seu correspondente antígeno presente na *Crithidia luciliae*. Uma vez unidos, os anticorpos manifestam-se através da incubação com um anticorpo contra as imunoglobulinas humanas conjugado com fluoresceína e visualizam-se por microscopia de fluorescência¹.

CONTEÚDO

		COD 50063	COD 50064
SLIDE	Lâminas	10 x 6 det.	10 x 12 det.
PBS	PBS (10x)	1 x 100 mL	-
CONTROL +	Contr. Posit. nDNA	1 x 1 mL	-
CONTROL -	Controlo Negativo	1 x 1 mL	-
CONJUGATE	IgG FITC/Evans	1 x 5 mL	-
MOUNT	Mounting Medium	1 x 5 mL	-
COVER SLD	Lamelas	1 x 12	-

COMPOSIÇÃO

SLIDE *Crithidia luciliae* fixadas em cada poço.

PBS Fosfato de sódio 112,5 mmol/L, fosfato de potássio 30 mmol/L, cloreto sódico 1,15 mol/L, azida de sódio 0,95 g/L, pH 7,2.

CONTROL+. Soro humano com anticorpos anti-DNA nativo (nDNA), azida de sódio 0,95 g/L.

CONTROL-. Soro humano, azida de sódio 0,95 g/L.

CONJUGATE Anticorpos de cabra anti-imunoglobulinas IgG humanas conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), azul de Evans 0,01 g/L, azida de sódio 0,95 g/L

MOUNT Meio de Montagem: Mowiol 1%, Glicerol 87%, Tris 20 mmol/L, azida de sódio 0,95 g/L.

Os soros humanos utilizados na preparação do controlo negativo e o controlo positivo eram negativos para o antígeno HBs e para os anticorpos anti-HCV e anti-HIV. Não obstante, os controlos devem ser tratados com precaução como potencialmente infecciosos.

CONSERVAÇÃO

Conservar a 2-8°C.

Os reagentes são estáveis até à data de caducidade indicada na etiqueta sempre que se conservem bem fechados e se evite a contaminação durante o seu uso.

Indicações de deterioração:

– Componentes líquidos: Presença de partículas, turvação.

- Lâminas: Roturas no pacote contentor, defeitos macroscópicos como raladuras ou descolagens no cultivo das células.

REAGENTES AUXILIARES

PBS PBS (10x).

CONJUGATE IgG FITC/Evans.

MOUNT Meio de Montagem.

CONTROL+. Controlo Positivo nDNA: Soro humano com anticorpos anti-DNA nativo (nDNA), azida de sódio 0,95 g/L.

CONTROL-. Controlo Negativo.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

PBS: Efetuar uma diluição a 1/10 do PBS com água destilada. Estável 1 mês a 2-8°C se for conservado à temperatura recomendada, bem fechado e tendo cuidado para evitar contaminações durante a sua utilização.

Os outros componentes estão prontos a utilizar.

EQUIPAMENTO ADICIONAL

- Câmara húmida
- Cuvete de lavagem
- Microscópio de fluorescência equipado com filtros de excitação de 495 nm e de emissão de 525 nm para a visualização do FITC.

AMOSTRAS

Soro ou plasma recolhidos através de procedimentos standard. Estável uma semana a 2-8°C.

Diluir as amostras 1/10 em PBS (ver Preparação dos Reagentes) antes do ensaio.

Para a titulação de uma amostra positiva, realizar diluições duplas em PBS a partir da 1/20.

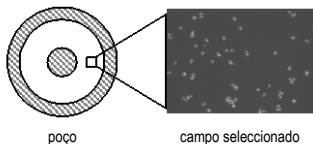
No entanto, cada laboratório deverá estabelecer o seu próprio exemplo de diluição baseado nas características da população.

PROCEDIMENTO

1. Temperar os reagentes e as amostras à temperatura ambiente.
2. Depositar uma gota (50 μ L) da amostra diluída ou dos Controlos nos poços da lâmina, tentar cobrir perfeitamente (Nota 1).
3. Incubar a lâmina na câmara húmida durante 30 minutos à temperatura ambiente (15-30°C).
4. Eliminar as gotas das amostras inclinando a lâmina e dar golpes suavemente. Evitar a mistura de soros.
5. Eliminar o soro restante na lâmina lavando-a com PBS (ver preparação do Reagente) (Nota 2).
6. Lavar a lâmina submergindo-a numa cuvette com PBS durante 5 minutos. Substituir o PBS e repetir a lavagem.
7. Secar cuidadosamente a lâmina utilizando o papel absorvente fornecido. El substrato deve permanecer sempre húmido.
8. Depositar uma gota do Conjugate em cada poço. Colocar a lâmina numa câmara húmida e incubar à temperatura ambiente (15-30°C) durante 30 minutos.
9. Lavar (ver passo 6) e secar (ver passo 7).
10. Depositar várias gotas do Mounting Medium sobre a lâmina e colocar uma lamela evitando a formação de bolhas de ar.

LEITURA

Examinar a lâmina com um microscópio de fluorescência (250-400x). É recomendável realizar a leitura imediatamente. Para realizar a leitura, seleccionar campos de observação da zona indicada no esquema, entre o centro e a periferia do poço, com a distribuição de células uniformes. A intensidade da marcação da periferia ou do centro do poço não é representativa da preparação.



poço

campo seleccionado

A *Crithidia luciliae* é um hemoflagelado que possui uma mitocôndria modificada, denominada kinetoplasto, que contém DNA de hélice dupla (nDNA), não associado às histonas, e que aparentemente não apresenta nenhum outro antígeno. O kinetoplasto é um orgânulo de aspecto arredondado, de tamanho inferior ao núcleo e situado entre este e o corpúsculo basal (2,3,4).

A observação da marcação fluorescente específica no kinetoplasto à diluição recomendada indica um resultado positivo. O núcleo, o corpo basal ou o flagelo podem originar uma marcação fluorescente, mas só deve ser considerada a fluorescência do kinetoplasto.

As amostras positivas podem ser tituladas. Define-se o título como a diluição maior que dá resultado positivo.

CONTROLO DE QUALIDADE

O Controlo Positivo (CONTROL+) e o Controlo Negativo (CONTROL-) fornecidos com os kits cod 50063 devem ser ensaiados junto com as amostras dos pacientes para verificar a funcionalidade do procedimento de ensaio.

O Controlo Positivo (CONTROL+) deve proporcionar a marcação específica descrita no item anterior.

O Controlo Negativo (CONTROL-) não deve proporcionar nenhuma marcação específica.

Cada laboratório deve estabelecer o seu próprio programa de Controlo de Qualidade interna, assim como os procedimentos de correção no caso em que os controlos não cumpram com as tolerâncias aceitáveis.

CARACTERÍSTICAS DO ENSAIO

O conjugado IgG FITC/Evans está calibrado face ao Padrão Internacional da OMS de anti-imunoglobulinas humanas de ovelha conjugadas com FITC.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

A determinação dos anticorpos anti-dsDNA por imunofluorescência na *Crithidia luciliae* tem uma elevada especificidade diagnóstica, contudo tem uma sensibilidade diagnóstica moderadamente elevada para o Lúpus Eritematoso Sistémico (SLE). Estes anticorpos são os que se detectam com mais frequência em SLE: 95% nos pacientes com SLE com implicação renal; 50 – 70% nos pacientes com SLE sem implicação renal; e 40% nos pacientes com SLE inactivo. Os anticorpos anti-dsDNA raramente se encontram em indivíduos saudáveis (5).

O kit de anti-nDNA da BioSystems foi usado com 80 soros de pacientes com SLE assim como em doadores saudáveis. Os resultados aparecem a continuação:

	N	POS	NEG	Sens.	Espec.
SLE (<i>lúpus eritematoso sistémico</i>)	43	29	14	67%	100%
SLE sem implicação renal	25	15	10	60%	100%
SLE com implicação renal	18	14	4	78%	100%
Outras Doenças Auto-imunes	20	0	20		
Controlos saudáveis	17	0	17		

O diagnóstico clínico não deve basear-se exclusivamente no resultado deste ensaio, senão que deve integrar os dados clínicos e de laboratório.

NOTAS

1. Evitar tocar as células do poço durante todo o procedimento.
2. Utilizar um frasco de lavagem ou uma pipeta para esta lavagem, evitando a possível contaminação com as amostras adjacentes.

BIBLIOGRAFIA

1. Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Aarden A, de Groot ER and Feltkamp TEW. Immunology of DNA III. Crithidia luciliae, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique. Ann NY Acad Sci 1975; 254: 505-515.
3. Stingl G et al. An Immunofluorescence Procedure for the Demonstration of Antibodies to Native, Double-Stranded DNA and Circulating DNA-Anti-DNA Complexes. Clin Immunol and Immunopathol 1976; 6: 131-140.
4. Konstantinov KN and Russanova VR. Evidence for absence of histones in the Crithidia luciliae kinetoplast: a study with anti-H2A and monoclonal anti-H3 antibodies. British Journal of Dermatology 1987; 117: 451-456.
5. Conrad K, Schöfler W, Hiepe F. Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases. A Diagnostic Reference. Autoantigens, autoantibodies, autoimmunity. Vol. 2. Pabst Science Publishers, 2002.



ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ANTI-nDNA (nDNA)

Εμμεσος Ανοσοφθορισμός CRITHIDIA LUCILIAE



A. MENARINI
diagnostics

κωδ 50063 20 x 12 προσδιορισμοί

κωδ 50064 10 x 12 προσδιορισμοί

Μόνο για in vitro χρήση σε κλινικό εργαστήριο

ΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Αντιδραστήρια για τον ποιοτικό προσδιορισμό αντισώματα αντι-nDNA σε ανθρώπινο ορό με έμμεσο ανοσοφθορισμό.

ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα αντισώματα αντι-nDNA του ορού ενώνονται με το αντίστοιχο αντιγόνο τους παρόν σε *Crithidia luciliae*. Μετά την ένωση, τα αντισώματα εκδηλώνονται με επίωση με ένα αντίσωμα κατά των ανθρώπινων ανοσοσφαιρινών συζευγμένο με φθορισκίνη και είναι ορατά δια μικροσκοπίας φθορισμού¹.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ

		COD 50063	COD 50064
SLIDE	Πλακίδιο	10 x 6 προ.	10 x 12 προ.
PBS	PBS (10x)	1 x 100 mL	-
CONTROL +	Θετικός έλεγχος nDNA	1 x 1 mL	-
CONTROL -	Αρνητικός έλεγχος	1 x 1 mL	-
CONJUGATE	IgG FITC/Evans	1 x 5 mL	-
MOUNT	Mounting Medium	1 x 5 mL	-
COVER SLD	Κάλυμα	1 x 12	-

ΣΥΝΘΕΣΗ

SLIDE *Crithidia luciliae* σε κάθε κοιλότητα.

PBS Φωσφορικό νατρίου 112.5 mmol/L, φωσφορικό καλίου 30 mmol/L, χλωριούχο νάτριο 1.15 mol/L, αζίδιο νατρίου 0.95 g/L, pH 7.2.

CONTROL+ Ανθρώπινος ορός με αντισώματα αντι-φυσικού DNA (nDNA), αζίδιο νατρίου 0.95 g/L.

CONTROL- Ανθρώπινος ορός, αζίδιο νατρίου 0.95 g/L.

CONJUGATE Αντισώματα αιγός ανθρώπινης αντι-ανοσοσφαιρίνης IgG συζευγμένα με ισοθειοκυανική φθορισκίνης (FITC), κυανό του Evans 0.01 g/L, αζίδιο νατρίου 0.95 g/L

MOUNT Μέσο ζεύξης: Mowiol 1%, Γλυκερίνη 87%, Tris 20 mmol/L, αζίδιο νατρίου 0.95 g/L.

Οι ανθρώπινοι οροί που χρησιμοποιήθηκαν στην προετοιμασία του αρνητικού και του θετικού ελέγχου ήταν αρνητικοί για το αντιγόνο HBs και για τα αντισώματα αντι-VCH και αντι-VIH. Παρόλα αυτά, οι έλεγχοι θα πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή προς αποφυγή ενδοχομένων μολύνσεων.

ΦΥΛΑΞΗ

Φύλαξη στους 2-8°C.

Τα αντιδραστήρια είναι σταθερά μέχρι την αναγραφόμενη στην ετικέτα ημερομηνία λήξης, όταν φυλάσσονται καλά κλεισμένα και δεν επιμολύνονται κατά τη διάρκεια της χρήσης τους.

Ενδείξεις αλλοίωσης:

– Υγρά συστατικά: Εμφάνιση μικροσωματιδιακού υλικού, θολερότητα.

- Πλακίδιο: Σχισμές στη συσκευασία, μακροσκοπικά ελαττώματα όπως χαράξεις ή αποκολλήσεις στην καλλιέργεια των κυττάρων.

ΒΟΗΘΗΤΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

PBS PBS (10x).

CONJUGATE IgG FITC/Evans.

MOUNT Μέσο ζεύξης.

CONTROL+ Θετικός έλεγχος pDNA: Ανθρώπινος ορός με αντισώματα αντι-φυσικού DNA (pDNA), αζίδιο νατρίου 0.95 g/L.

CONTROL- Αρνητικός έλεγχος.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

PBS: Αραιώστε το PBS σε αναλογία 1/10 με απεσταγμένο νερό. Σταθερό για 1 μήνα σε θερμοκρασία 2-8°C, εφόσον φυλάσσεται στη συνιστώμενη θερμοκρασία, καλά κλειστό, και δοθεί η δέουσα προσοχή ώστε να αποτραπεί τυχόν μόλυνση κατά τη διάρκεια της χρήσης.

Τα υπόλοιπα συστατικά παρέχονται έτοιμα προς χρήση.

ΠΡΟΣΘΕΤΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- Υγρός θάλαμος
- Κυψελίδα πλήυσης
- Μικροσκόπιο φθορισμού με φίλτρα διέγερσης των 495 nm και έκλυσης των 525 nm για την οπτική παρουσίαση του FITC.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Ορός ή πλάσμα που συλλέγονται με τις συνήθεις διαδικασίες. Σταθερό μία εβδομάδα στους 2-8°C.

Αραιώστε τα δείγματα 1/10 σε PBS (βλ. Προετοιμασία Αντιδραστηρίων) πριν από την εξέταση.

Για την πιλοποίηση ενός θετικού δείγματος, πραγματοποιήστε αραιώσεις διπλής σε PBS πάνω από 1/20.

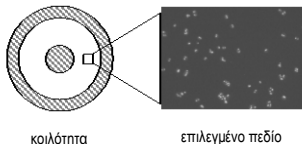
Κάθε εργαστήριο όμως, θα πρέπει να ορίσει το δικό του παράδειγμα αραιώσεως βασισμένο στα χαρακτηριστικά του πληθυσμού.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Φέρτε τα αντιδραστήρια και τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Ρίξτε μία σταγόνα (50 µL) του αραιωμένου δείγματος ή των Ελέγχων στις κοιλότητες του πλακιδίου, σκεπάζοντάς το εντελώς (Παρατήρηση 1).
3. Επλώστε το πλακίδιο σε υγρό θάλαμο για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (15-30°C).
4. Απορρίψτε τις σταγόνες των δειγμάτων γέρνοντας το πλακίδιο και χτυπώντας το ελαφρά. Αποφύγετε την ανάμιξη ορών.
5. Απορρίψτε τα υπολείμματα ορού από το πλακίδιο ξεπλένοντάς το με PBS (βλ. προετοιμασία Αντιδραστηρίου). (Παρατήρηση 2).
6. Πλύνετε το πλακίδιο βυθίζοντάς το σε μία κυψελίδα με PBS για 5 λεπτά. Αλλάξτε το PBS και επαναλάβετε την πλήυση.
7. Στεγνώστε προσεκτικά το πλακίδιο με το ειδικό απορροφητικό χαρτί. Το υπόστρωμα πρέπει να παραμείνει πάντα υγρό.
8. Ρίξτε μια σταγόνα Conjugate σε κάθε κοιλότητα. Τοποθετήστε το πλακίδιο σε έναν υγρό θάλαμο και επλώστε σε θερμοκρασία δωματίου (15-30°C) για 30 λεπτά.
9. Πλύνετε (βλ. βήμα 6) και στεγνώστε (βλ. βήμα 7).
10. Ρίξτε μερικές σταγόνες Mounting Medium πάνω στο πλακίδιο και τοποθετήστε ένα κάλυμμα προσέχοντας να μη σχηματιστούν φυσαλίδες.

ΑΝΑΓΝΩΣΗ

Εξετάστε το πλακίδιο με ένα μικροσκόπιο φθορισμού (250-400x). Συνιστάται η ανάγνωση να πραγματοποιείται αμέσως. Για να πραγματοποιήσετε την ανάγνωση, επιλέξτε πεδία παρατήρησης της περιοχής που υποδεικνύεται στο σχέδιο, μεταξύ του κέντρου και της περιφέρειας του πλακιδίου, με κατανομή ομοιόμορφων κυττάρων. Η ένταση της χρώσης της περιφέρειας ή του κέντρου του πλακιδίου δεν είναι ενδεικτική της προετοιμίας.



Η *Crithidia luciliae* είναι ένα αιμομαστίγιο με τροποποιημένη μιτοχονδρία, επωνομαζόμενο κινητοπυρήν, που περιέχει δίκλωνο DNA (nDNA), μη συνδεδεμένο με ιστόνες, και που προφανώς δεν παρουσιάζει κανένα άλλο αντιγόνο. Ο κινητοπυρήν είναι ένα στρογγυλό οργανίδιο, μικρότερο σε μέγεθος από τον πυρήνα του κυττάρου και θέση ανάμεσα σε αυτόν και το βασικό οξείδιο^(2,3,4).

Η παρατήρηση συγκεκριμένης χρώσης φθορισμού στον κινητοπυρήνα στην προτεινόμενη αραίωση αποτελεί ένδειξη θετικού αποτελέσματος. Ο πυρήνας, το βασικό οξύδιο ή το μαστίγιο μπορούν να προκαλέσουν χρώση φθορισμού, αλλά θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη μόνο ο φθορισμός του κινητοπυρήνα.

Τα θετικά αποτελέσματα μπορούν να τιτλοποιηθούν. Ως τίτλος ορίζεται η μεγαλύτερη αραίωση που δίνει θετικό αποτέλεσμα.

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Ο Θετικός Έλεγχος (CONTROL+) και ο Αρνητικός Έλεγχος (CONTROL-) που παρέχονται μαζί με τα κιτ κωδ 50063 θα πρέπει να ελέγχονται παράλληλα με τα δείγματα των ασθενών για την επαλήθευση της εγκυρότητας της ανάλυσης.

Ο Θετικός Έλεγχος (CONTROL+) θα πρέπει να παρουσιάζει τη συγκεκριμένη χρώση που περιγράφεται ανωτέρω.

Ο Αρνητικός Έλεγχος (CONTROL-) δεν πρέπει να παρουσιάζει καμία συγκεκριμένη χρώση.

Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του σχήμα εσωτερικού Ποιοτικού Ελέγχου, καθώς και επιδιορθωτικές διαδικασίες για την περίπτωση που οι έλεγχοι δεν βρίσκονται εντός των αποδεκτών ορίων.

ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Το σύμπλοκο IgG FITC/Evans έχει μετρηθεί με βάση το Διεθνές Πρότυπο της Π.Ο.Υ. για ανθρώπινη αντι-ανοσοσφαιρίνη από πρόβατα συζευγμένο με FITC.

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Ο προσδιορισμός αντισωμάτων αντι-dsDNA δια ανοσοφθορισμού σε *Crithidia luciliae* παρουσιάζει υψηλή διαγνωστική ειδικότητα, και ελαφρά υψηλή διαγνωστική ευαισθησία για τον Διάχυτο Ερυθματώδη Λύκο (SLE). Τα αντισώματα αυτά παρατηρούνται πιο συχνά στον SLE: 95% των ασθενών με SLE με νεφρική επιπλοκή, 50 – 70% των ασθενών με SLE χωρίς νεφρική επιπλοκή και 40% των ασθενών με αδρανή SLE. Τα αντισώματα αντι-DNA σπάνια συναντώνται σε υγιή άτομα⁽⁵⁾.

Το κιτ αντι-nDNA της BioSystems χρησιμοποιήθηκε με 80 ορούς πασχόντων από SLE, καθώς και υγιών δωρητών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στη συνέχεια:

	ΟΥΔ	ΘΕΤ	ΑΡΝ	Ευαισθ.	Ειδικ.
SLE (διάχυτος ερυθματώδης λύκος)	43	29	14	67%	100%
SLE χωρίς νεφρική επιπλοκή	25	15	10	60%	100%
SLE με νεφρική επιπλοκή	18	14	4	78%	100%
Λοιπές Αυτοάνοσοι Νόσοι	20	0	20		
Υγιείς έλεγχοι	17	0	17		

Η κλινική διάγνωση δεν θα πρέπει να βασίζεται στο αποτέλεσμα μιας μόνο εξέτασης, αλλά να συνεκτιμά τόσο τα κλινικά όσο και τα εργαστηριακά δεδομένα.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

1. Μην αγγίζετε τα κύτταρα της κοιλότητας καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.
2. Χρησιμοποιείτε φιάλη πλύσης ή πιπέττα για αυτή την πλύση, αποφεύγοντας την πιθανή επιμόλυνση από τα παρακείμενα δείγματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Melnickoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Aarden LA, de Groot ER and Feltkamp TEW. Immunology of DNA III. Crithidia luciliae, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique. Ann NY Acad Sci 1975; 254: 505-515.
3. Stingl G et al. An Immunofluorescence Procedure for the Demonstration of Antibodies to Native, Double-Stranded DNA and Circulating DNA-Anti-DNA Complexes. Clin Immunol and Immunopathol 1976; 6: 131-140.
4. Konstantinov KN and Russanova VR. Evidence for absence of histones in the Crithidia luciliae kinetoplast: a study with ant-H2A and monoclonal anti-H3 antibodies. British Journal of Dermatology 1987; 117: 451-456.
5. Conrad K, Schöblier W, Hiepe F. Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases. A Diagnostic Reference. Autoantigens, autoantibodies, autoimmunity. Vol. 2. Pabst Science Publishers, 2002.



ANTI-nDNA-ANTIKÖRPER (nDNA)

Indirekte Immunfluoreszenz CRITHIDIA LUCILIAE



AMENARINI
diagnostics

COD 50063 20 x 12 Bestimmungen

COD 50064 10 x 12 Bestimmungen

In-vitro-Diagnostikum für das klinische Labor

VERWENDUNGSZWECK

Testreagenzien qualitativ zur Bestimmung von Anti-nDNA-Antikörper in Humanserum mittels indirekter Immunfluoreszenz verwendet werden.

METHODENPRINZIP

Anti-nDNA-Antikörper im Serum binden an das entsprechende Antigen in Crithidia luciliae. Die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe werden mittels Fluorescein-markierten Antikörpern gegen humanes Immunglobulin nachgewiesen und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht.¹

INHALT

		COD 50063	COD 50064
SLIDE	Objekträger	10 x 6 Best.	10 x 12 Best.
PBS	PBS (10x)	1 x 100 mL	-
CONTROL +	nDNA Posit. Kontrolle	1 x 1 mL	-
CONTROL -	Negative Kontrolle	1 x 1 mL	-
CONJUGATE	IgG FITC/Evans	1 x 5 mL	-
MOUNT	Mounting Medium	1 x 5 mL	-
COVER SLD	Deckgläschen	1 x 12	-

ZUSAMMENSETZUNG

SLIDE Crithidia luciliae, fixiert in jedem Feld.

PBS Natrium phosphate 112.5 mmol/L, potassium phosphate 30 mmol/L, sodium chloride 1.15 mol/L, sodium azide 0.95 g/L, pH 7.2.

CONTROL+ Humanserum mit anti-Native-DNA Antikörper (nDNA), Natriumazid 0.95 g/L.

CONTROL- Humanes Serum, sodium azide 0.95 g/L.

CONJUGADO Ziege-Anti-humanes IgG Konjugat mit Fluorescein Isothiocyanate (FITC), Evans blue 0.01 g/L, sodium azide 0.95 g/L.

MOUNT Eindeckmedium: Mowiol 1%, Glycerol 87%, Tris 20 mmol/L, sodium azide 0.95 g/L.

Alle Seren humanen Ursprungs, die für die Herstellung von Negativ- oder Positivkontrollen benutzt wurden, sind auf Vorhandensein von HIV Antikörpern, HCV Antikörpern und HBs Antigen getestet worden und als negativ bewertet worden. Dennoch sollten alle Kontrollen als potentiell infektiös behandelt werden.

LAGERUNG

Lagerung bei 2-8°C.

Die Reagenzien sind bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar, wenn sie gut verschlossen gelagert werden und keine Verunreinigung während des Gebrauchs auftritt.

Hinweise zum Nichtgebrauch:

- Flüssige Bestandteile: Trübung oder Vorhandensein von Niederschlägen.

- Objektträger: Risse in der versiegelten Verpackung, makroskopisch sichtbare Defekte in der Zellkultur wie Kratzer oder Ablösen der Zellschicht.

ZUSATZREAGENZIEN

PBS PBS (10x).

CONJUGATE IgG FITC/Evans.

MOUNT Eindeckmedium.

CONTROL+ nDNA positive Kontrolle: Humanserum mit anti-Native-DNA Antikörper (nDNA), Natriumazid 0.95 g/L.

CONTROL- Negative Kontrolle.

REAGENZIVORBEREITUNG

PBS: Stellen Sie eine Verdünnung der PBS 1/10 mit destilliertem Wasser her. Diese ist 1 Monat lang stabil, falls sie immer bei 2-8°C gelagert, dicht verschlossen gehalten und wenn sorgfältig darauf geachtet wird, jegliche Kontamination während des Gebrauchs zu vermeiden.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

- Feuchte Kammerr
- Wasch-Küvette
- Für das Sichtbarmachen der FITC Markierung wird ein Fluoreszenz Mikroskop mit einem Anregungsfilter von 495 nm und einem Emissionsfilter von 525 nm benötigt.

PROBEN

Für den Test kann Serum oder Plasma eingesetzt werden. Diese sollten innerhalb einer Woche verwendet werden und bei 2-8°C gelagert werden.

Die Proben werden 1/10 in PBS (siehe Vorbereitung der Reagenzien) vorverdünnt bevor sie in den Test eingesetzt werden. Für die weitere Titration positiver Proben, diese in zweifachen Verdünnungsschritten, ausgehend von 1/20 in PBS weiterverdünnen.

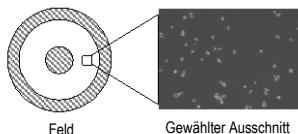
Jedes Labor muss jedoch ein eigenes Verdünnungsverhältnis ermitteln, das die Besonderheiten der Bevölkerungsstruktur berücksichtigt.

VERFAHREN

1. Alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur bringen.
2. Von den verdünnten Proben oder Kontrollen je einen Tropfen (50 µL) auf ein Feld des Objektträgers tropfen. Es ist wichtig, dass das Feld vollständig bedeckt ist (Anmerkung 1).
3. 30 min in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur (15-30°C) inkubieren.
4. Überschüssige Tropfen vorsichtig abschütteln, dabei Kreuz-Kontamination der Seren vermeiden.
5. Den Objektträger vorsichtig mit PBS (siehe Vorbereitung der Reagenzien) abspülen (Anmerkung 2).
6. Den Objektträger in einer mit PBS gefüllten Wasch-Küvette 5 min waschen. Das PBS wechseln und das Waschen wiederholen.
7. Den Objektträger mit Hilfe des mitgelieferten Blotting Papiers vorsichtig trocknen. Das Substrat darf nicht austrocknen
8. Einen Tropfen von Conjugate auf jedes Feld auftragen. Den Objektträger dann für 30 min bei Raumtemperatur (15-30°C) in der Feuchtkammer inkubieren.
9. Wiederum waschen (Punkt 6) und trocknen (Punkt 7).
10. Einige Tropfen von Mounting Medium auf den Objektträger geben und mit einem Deckglas abdecken, dabei das Bilden von Luftblasen vermeiden.

AUSWERTUNG

Werten Sie den Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop (250-400x) aus. Die besten Ergebnisse lassen sich erzielen, wenn die Auswertung der Objektträger sofort erfolgt. Wählen Sie, wie in der Abbildung angegeben, einen Ausschnitt mit gleichmäßiger Zellverteilung, der sich zwischen dem zentralen Bereich und dem Randbereich befindet, da die Fluoreszenzintensität in der Mitte und am Rand für die Präparation nicht repräsentativ ist.



Crithidia luciliae ist ein Hämoflagellat, der ein als Kinetoplast bezeichnetes modifiziertes Mitochondrium mit Doppelstang-DNA (nDNA) enthält, nicht mit Histonen assoziiert ist und offenbar kein weiteres Kernantigen aufweist. Der Kinetoplast ist eine runde Organelle, die kleiner als der Zellkern ist und sich zwischen diesem und dem Basalkörper befindet (2,3,4).

Zeigen die Kinetoplasten in der empfohlenen Verdünnung eine spezifische Fluoreszenzfärbung, gilt dies als positives Ergebnis. Der Zellkern, der Basalkörper oder das Flagellum können zwar ebenfalls eine Fluoreszenzfärbung aufweisen, aber nur die Fluoreszenz des Kinetoplasten ist zu berücksichtigen.

Positive Seren können ausstitriert werden. Der Serumtiter ist definiert als die letzte Verdünnungsstufe, bei der noch ein positives Ergebnis festgestellt wird.

QUALITÄTS KONTROLLE

Die im Testkit cod 50063 enthaltene positive (CONTROL+) und negative Kontrolle (CONTROL-) sollten zusammen mit den Patientenserum angesetzt werden, um die Durchführung als gültig zu bezeichnen.

Die positive Kontrolle (CONTROL+) sollte die oben beschriebene spezifische Fluoreszenz liefern.

In der negativen Kontrolle (CONTROL-) sollte keine spezifische Färbung zu sehen sein.

Jedes Labor sollte sein eigenes internes Labor Qualitätsschema für die korrekte Durchführung aufstellen, falls Kontrollen nicht in der angegebenen Zeit reagieren sollten.

TEST CHARAKTERISIERUNG

Der IgG FITC/Evans Konjugat ist gegen Internationales Muster der WHO von menschlichen Anti-immunoglobulin von Schaf kalibriert und mit FITC-Konjugiert.

DIAGNOSTISCHE EIGENSCHAFTEN

Der *Crithidia-luciliae*-Immunfluoreszenztest auf Anti-nDNA-Antikörper besitzt für systemischen Lupus erythematodes (SLE) zwar eine hohe diagnostische Spezifität, aber nur eine mäßige diagnostische Sensitivität. Anti-nDNA-Antikörper zählen zu den am häufigsten nachgewiesenen Autoantikörpern, die mit SLE assoziiert sind: Sie kommen bei 95% der SLE-Patienten mit Nierenbeteiligung, bei 50 – 70% der SLE-Patienten ohne Nierenbeteiligung und bei 40% der Patienten mit inaktivem SLE vor. Bei Gesunden werden sie hingegen kaum gefunden.⁽⁵⁾

Der Testkit Anti-nDNA-Antikörper von BioSystems wurde mit 80 Seren von SLE-Patienten und gesunden Spendern überprüft. Die Ergebnisse sind im folgenden beschrieben.

	N	Pos.	Neg.	Sens.	Spez.
SLE: (systemischer Lupus erythematodes)	43	29	14	67%	100%
<i>SLE ohne Nierenbeteiligung</i>	25	15	10	60%	100%
<i>SLE mit Nierenbeteiligung</i>	18	14	4	78%	100%
Andere Autoimmunkrankheiten	20	0	20		
Kontrollen Gesunder	17	0	17		

Die klinische Diagnose sollte nicht nur anhand eines einzigen Testergebnisses, sondern der Gesamtheit der klinischen Befunde und Laborergebnisse gestellt werden.

ANMERKUNGEN

1. Die fixierten Zellen auf dem Objektträger während der Durchführung nicht berühren.
2. Beim Waschen der Objektträger eine Spritzflasche oder eine Pipette verwenden, um Kreuzreaktionen der benachbarten Felder zu vermeiden.

LITERATUR

1. Melnickoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Aarden LA, de Groot ER and Feltkamp TEW. Immunology of DNA III. Crithidia luciliae, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique. Ann NY Acad Sci 1975; 254: 505-515.
3. Stingl G et al. An Immunofluorescence Procedure for the Demonstration of Antibodies to Native, Double-Stranded DNA and Circulating DNA-Anti-DNA Complexes. Clin Immunol and Immunopathol 1976; 6: 131-140.
4. Konstantinov KN and Russanova VR. Evidence for absence of histones in the Crithidia luciliae kinetoplast: a study with ant-H2A and monoclonal anti-H3 antibodies. British Journal of Dermatology 1987; 117: 451-456.
5. Conrad K, Schöflner W, Hiepe F. Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases. A Diagnostic Reference. Autoantigens, autoantibodies, autoimmunity. Vol. 2. Pabst Science Publishers, 2002.

MANUFACTURER: BioSystems S.A.
PRODUTTORE: Costa Brava 30
FABRICANTE: 08030 Barcelona (Spain)
FABRICANT: Tel: +34 93 311 00 00
ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗΣ: Fax: +34 93 311 76 09
HERSTELLER: Mail: Biosystems@biosystems.es

DISTRIBUTOR: A. Menarini Diagnostics SRL
DISTRIBUITORE: Via Sette Santi 3
DISTRIBUIDOR: 50131 Firenze
DISTRIBUTEUR: Tel. 0039-055-56801
ΔΙΑΝΟΜΕΑΣ: Fax 0039-055-5680-902
HÄNDLER: